

Estudio:

CARACTERIZACIÓN DE ALTERNARIA EN CEREZOS Y GENERACIÓN DE MEDIDAS PARA SU CONTROL SOBRE HUERTOS DE LA ZONA CENTRO SUR Y SUR

Elisa Miranda¹, Danitza Cabrera¹, Macarena Toledo², Alexandra Arenas², Héctor García¹.

¹ Laboratorios Diagnofruit Ltda. Depto. de Fitopatología Molecular. ² Laboratorios Diagnofruit Ltda. Depto de Microbiología

Resumen: La Pudrición Negra es una importante enfermedad que afecta cerezas en pre-cosecha, frecuencias cercanas al 5% son comunes en huertos en Chile y pueden llegar a más del 40% bajo ciertas condiciones ambientales dominantes en primavera. La sintomatología se caracteriza por una pudrición seca de tono oscuro, muy asociada a la sutura del fruto. Antecedentes internacionales señalan a *Alternaria alternata* como su agente causal, sin embargo, investigaciones en otros frutales plantean la posibilidad de un complejo de especies del género. El presente estudio tiene por objetivo recopilar y generar nuevos antecedentes de la enfermedad, en términos etiológicos, epidemiológicos y exploración de alternativas de control en virtud de la caracterización de las poblaciones locales gracias a estudios *in-vitro*. *Alternaria* es un grupo extremadamente complejo, pleomórfico lo que complica en extremo su clasificación, considerando además más de 270 especies descritas a la fecha. El género *Alternaria* se ha re-definido en función de análisis genéticos realizados en la última década, y se han podido determinar al menos 27 clados donde las distintas especies se agrupan en relación a su cercanía genética. En estudios realizados a aislados rescatados de frutos sintomáticos de la temporada 2017-18 se determinó que todos los individuos pertenecen a la Sección *Alternaria*. Genes Calmodulina y ATPasa de 46 individuos monospóricos aislados desde frutos sintomáticos desde temporada 2018-19, fueron secuenciados para análisis de multilocus. El 59, 20 y 13% correspondieron a *A. arborescens*, *A. alternata* y *A. destruens* respectivamente, evidenciando un complejo de especies del género en probable simpatria causando la enfermedad, resultados similares a los obtenidos en población analizada en 2017-18, donde *A. arborescens* y *A. alternata* dominaron la población estudiada. Otro importante punto para afinar el control es establecer las moléculas o grupos químicos más eficientes como Alternaricidas; en estudios anteriores carboxamidas, el fenilpirrol fludioxonil y triazoles muestran valores de EC₅₀ más bajos sobre *Alternaria spp.* en comparación a dicarboximidias u otros fungicidas de amplio espectro. De esta forma, la población en estudio se caracterizó en términos de su sensibilidad a formulaciones comerciales de los siguientes fungicidas: tebuconazole, pentiopirad y las mezclas Difenconazol&Azoxytrobina, Fludioxonil&Fenhexamid y Boscalid&Piraclostrobina. Como conclusión final y a través del análisis de toda la información recopilada y generada se propone un plan de manejo base para el control del patógeno en huertos de cerezo ajustable a la zona centro sur y sur de Chile.

Diagnofruit

Antecedentes Generales de Pudrición Negra en Cerezas

Muy pocos antecedentes publicados en el mundo son los que existen con respecto a esta enfermedad, probablemente el reporte más importante es de una investigación de China y, en la actualidad, los hallazgos realizados en Chile.

Alternaria es un conocido grupo de patógenos fúngicos, causante de enfermedades foliares, desde hortalizas a frutales, incluso en algunas especies forestales y ornamentales. En 2004 la enfermedad foliar (Zhu and Chang, 2004) “cherry leaf spot” (ChLS) causada por *Alternaria spp* fue reportada en China. Dos años más tarde la enfermedad fue descrita en Grecia (Thomidis and Tsipouridis, 2006), con incidencias entre 30% y 40% de las hojas. Las lesiones foliares aparecieron por primera vez a fines de la primavera. Estas correspondían a manchas pequeñas, redondas y negruzcas que gradualmente se agrandaron entre 2 a 5 mm de diámetro, con un borde morado marrón. En algunos lugares se volvió marrón grisáceo, pero la mayoría experimentó un crecimiento secundario y se volvió irregular y mucho más oscuro, adquiriendo una apariencia de “ojo de rana”. Sin embargo, esta enfermedad es muy poco recurrente en la zona central de Chile, o al menos es lo que hemos registrado en los dos últimos años. La mayor parte de ataques de este tipo son causados por bacterias del grupo *Pseudomonidos*, y en una proporción no cuantificada, por virus y factores abióticos.



Figura 1. Sintomatología asociada a ataque de *Alternaria spp*, ChLS. En hojas de cerezo cv. Sweet Heart, Región Del Maule 2018

Como se comentó anteriormente, y al igual que ChLS, la literatura es escasa en relación a la pudrición en frutos de cerezo denominada inicialmente como “Black Spot Disease” (BSD). La referencia más reciente es China (Zhao and Liu, 2012), donde en 2010 el 30% de los árboles de la producción local de Dalian fueron infectados por la enfermedad, reduciendo el rendimiento y la calidad de la fruta en cultivares de *Prunus cerasus*. Más grave aún fue el

tema considerando que la incidencia incrementó a un 75% en 2011. A medida que la enfermedad progresa en el fruto, las lesiones se van expandiendo, comenzando con una especie de *pitting* en la superficie del fruto, que luego se va marchitando dando lugar a la muerte del tejido afectado en forma de mancha necrótica. El patógeno identificado como agente causal de estas lesiones fue *Alternaria alternata*.



Figura 2. Sintomatología de Pudrición Negra o BSD en Cerezos Región de O'Higgins 2018.

El desarrollo de la enfermedad en Chile está marcado por la temporada. De esta forma, la temporada 2017-18 ha sido una de las más golpeadas, con huertos que alcanzaron hasta un 40% de pérdidas. Varios factores se podrían sumar para explicar el comportamiento en dicha temporada: probablemente una primavera húmeda, con lluvias en floración en ciertas localidades dieron el puntapié inicial. Un segundo factor a mencionar y registrar, fue el cambio normativo asumido por China en dicho momento con respecto a tolerancias y LMRs, que motivó a prescindir de ciertos activos que probablemente limitaron el control de este y otros patógenos.

En Chile se ha observado el desarrollo de una lesión invaginada de color oscuro, que comienza marrón y termina oscureciendo a negro. A medida que el fruto crece, esta lesión se va extendiendo y al madurar se hace más profunda (Figura 2). La lesión generalmente se asocia a la sutura y se puede generar en zonas proximales y medias del fruto, pudiendo o no comprometer la zona de aborto estilar; esto hace suponer una susceptibilidad al ataque en frutos aberrantes, que no sellaron bien debido a fallas en su proceso de génesis en la yema (ovario) (Figura 3); esto agrega un factor de incidencia que tendría su origen en la temporada anterior en el proceso de diferenciación.

Ovary Development

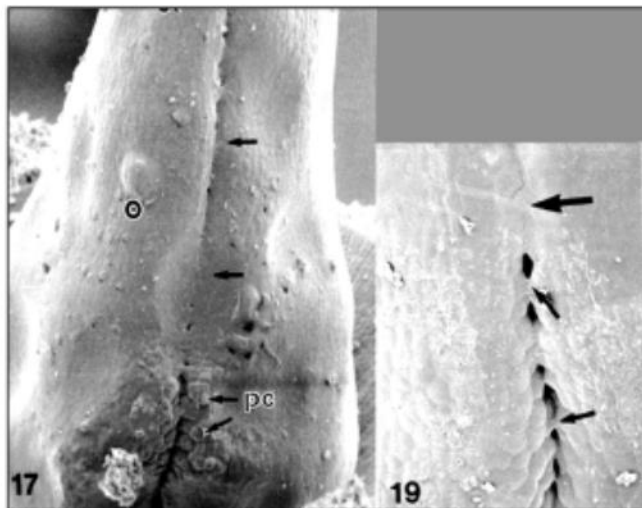


Figura 3. Ovario mal sellado (flechas) que podrían ser la puerta de entrada a Alternaria al recién exponerse al medioambiente. Principles of Fruit & Nut Tree Growth, Cropping and Management UC Davis, Feb. 26, 2013

Es fundamental generar estudios de forma inmediata que permitan entender la dinámica de desarrollo de frutos de las variedades más susceptibles a la enfermedad, y de esta manera, identificar los factores que influyen en el mal sellado de los ovarios. Es por esto que se deben registrar en el largo plazo parámetros de clima en verano que podrían ser los gestores de la aberración del fruto en la siguiente temporada, permitiendo la entrada de Alternaria en virtud de la presencia de inóculo.

Diagnofruit

El género *Alternaria* y su clasificación actual

Los hongos del género *Alternaria* se caracterizan por ser ubicuos, saprofitos y patógenos, generando graves enfermedades en plantas, productos agrícolas y semillas. Esta enfermedad se presenta como una mancha necrótica oscura que varía entre color marrón a gris, tanto en la parte foliar como en el fruto. (Woudenberg. J.Z 2013) de diversas especies. Estos hongos ocasionan pérdidas importantes en las exportaciones sobre una amplia gama de cultivos, que de forma resumida describen en la tabla 1.

Tabla 1. Enfermedades causadas por diversas especies del género *Alternaria*.

Hongo	hospedero	Enfermedad	Referencia
<i>A. alternata</i>	Manzanas	Mancha foliar	Elfar (2018)
<i>A. brassicicola</i>	Repollo y brócoli	Mancha negra	Dang. (2015)
<i>A. solani</i>	Papa y tomate	Tizón temprano	Dang (2015)
<i>A. longipes</i>	Tabaco	Mancha marrón	Woudenberg.(2015)
<i>A. mali</i>	Manzanas	Mancha	Woudenberg. (2015)
<i>A. gaisen</i>	Peras japonesas	Mancha negra	Woudenberg.(2015)
<i>A. arborescens</i>	tomate	Tallo chancro	Woudenberg. (2015)

A la fecha existen diversos estudios que han permitido definir de mejor manera la taxonomía de este género, describiendo hasta 275 especies diferentes (Simmons E. G. 2007). Posteriormente se han realizado estudios moleculares que han agrupado las distintas especies del género *Alternaria* en grupos taxonómicos que no siempre se correlacionan con los grupos de especies basados en características morfológicas similares (FRAC 2018). De esta forma, el género *Alternaria*, denominado hifomicetos alternarioideos, comprende un grupo de hongos ricos en biología, ecología y morfología, que ha sufrido un flujo taxonómico durante muchos años y que debe ser actualizado en nuestro país. La taxonomía de estos hongos se ha basado predominantemente en caracteres conidiales, que incluyen forma, color, septación y patrones de esporulación secundaria, y en menor medida en la asociación al huésped, la bioquímica y los metabolitos.

Basado en estudios del genoma parcial a través de estudios de Multilocus, Lawrence *et al.* en 2012 dividieron las especies de *Alternaria* en ocho principales secciones, dentro de las que se encuentran la mayor cantidad de especies fitopatógenas:

- Sección *Alternaria*, dentro de esta sección se pueden encontrar especies como *A. citriarbusti*, *A. tomaticola*, *A. toxicogenica*, *A. tenuissima*, *A. mali*, *A. citricancri*, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. gaisen* (Por más detalles de este y otras secciones ver Fig.4)
- Sección *Alternantherae*
- Sección *Porri*, donde se encuentran importantes especies como *A. solani*
- Sección *brassicicola*

- Sección Radicina
- Sección Infectoria, que se defina también como un sub grupo más alejado
- Sección Gypsophilae
- Sección Sonchi

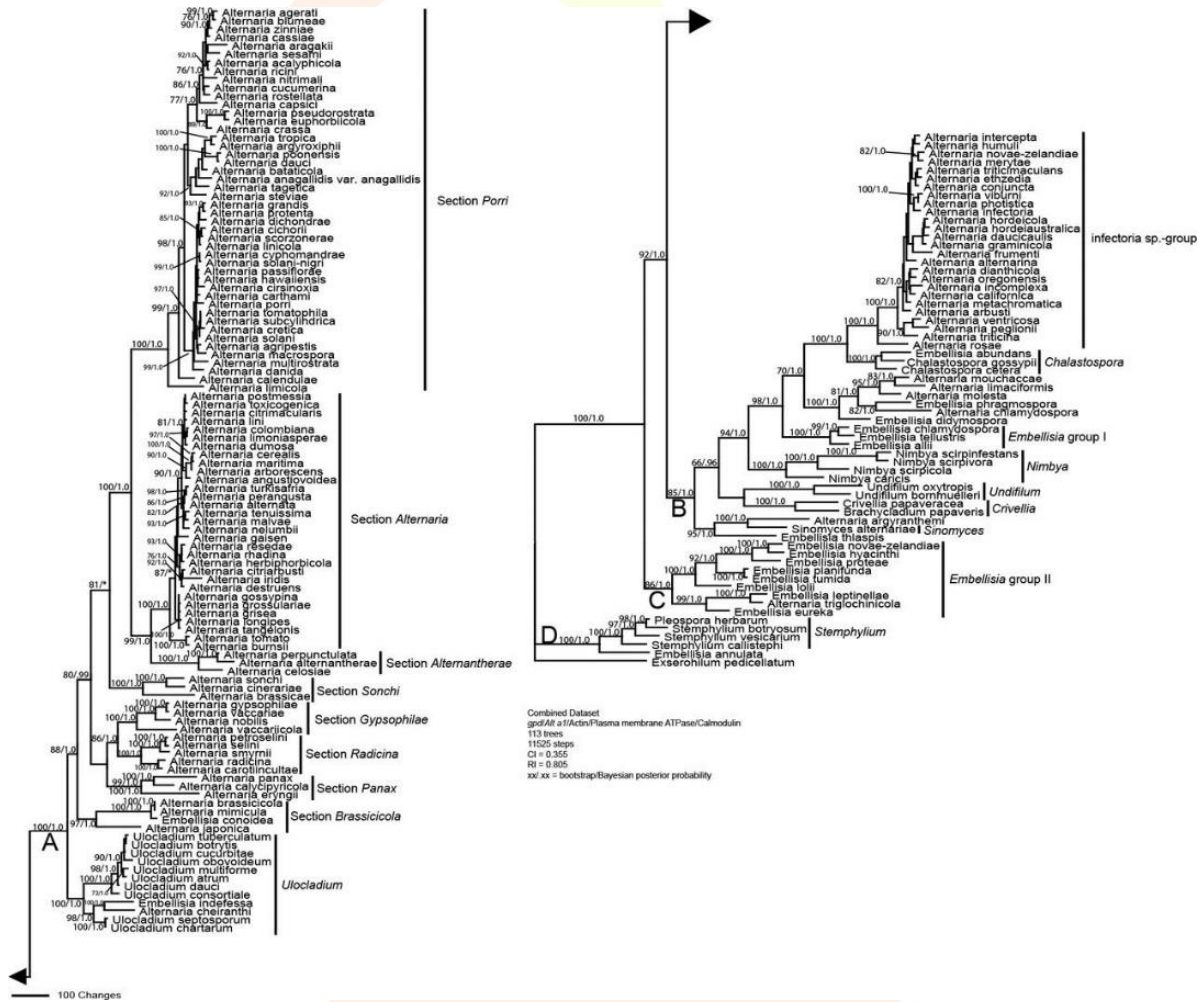


Figura 4. Uno de los 113 árboles generados a partir del análisis de máxima parsimonia del conjunto de datos combinado de cinco genes. El número delante de la barra representa los valores de arranque de parsimonia de 1000 réplicas, y el número después de la barra representa las probabilidades bayesianas posteriores. Los valores representados por un asterisco fueron inferiores al 70% para bootstrap o inferiores a 0,95 para la probabilidad posterior bayesiana, respectivamente. La barra de escala indica el número de sustitución de nucleótidos. Lawrence et al. 2012



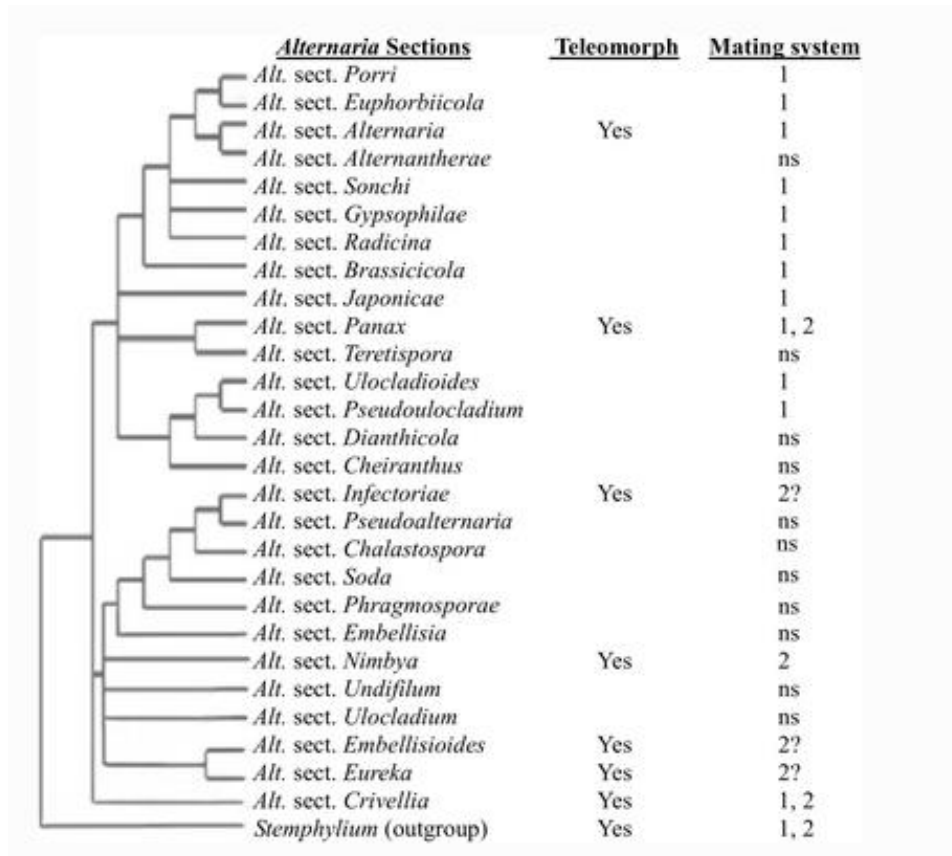


Figura 5. Filogenia, taxonomía y sistema de apareamiento de los hifomicetos alternarioideos. Cladificación derivada de la combinación manual de cuatro árboles filogenéticos basada en el análisis de secuencias de siete genes nucleares (Lawrence et al. 2013, 2014; Woudenberg et al. 2013; Grum-Grzhimaylo et al. 2015). Tipo de sistema de apareamiento: 1 heterotalismo, solo uno de los dos idiomorfos del locus MAT1 presente en un genoma; 2 homotalismo, ambos idiomorfos del locus MAT1 presentes en un genoma; ns no estudiados (datos para la sección *Infectoriae* obtenidos de Andersen et al. 2009; datos para la sección *Nimbya* obtenida de Johnson et al. 2002; datos para la sección *Crivellia* obtenida de Inderbitzin et al. 2006; datos para *Stemphylium* obtenido de Inderbitzin et al. 2005; otros datos obtenidos de Gannibal y Kazartsev 2013))

Hoy en día, la identificación precisa de un taxón o grupo de taxones dentro del género *Alternaria* se eleva al menos a 27 clados que incluyen diferentes especies de este género dentro de ellos, ver Fig. 5 (Lawrence et al., 2014).

Para complicar aún más el ordenamiento, dentro de dichos clados, existen propuestas de subclasificaciones; entre éstas un de vital importancia para este estudio es la sub-sección *Alternata* (que se encuentra dentro de la sección de grupo *Alternaria*), esta es extensa en cuanto al número de especies que la componen (Figura 4), no presentan fase sexual en su gran mayoría, y como revisaremos en análisis locales, es el grupo dominante presente en lesiones de Pudrición Negra en nuestras cerezas. Esta sección, *Alternaria*, se ha descrito principalmente en función de la morfología y / o especificidad del hospedero; sin embargo, la variación fenotípica y genética entre sus individuos es mínima, por eso su clasificación se ha vuelto cada vez más compleja.

Tal como se comentó en párrafos anteriores, Lawrence et al. (2012), en uno de sus primeros estudios a través de en la utilización de cinco genes concatenados y análisis multilocus de

GAPDH, *Alt a 1*, *actina*, *ATPasa de membrana plasmática* y *calmodulina*, pudieron establecer ocho grupos de especies dentro del género *Alternaria*: siete clados "asexuales" y clado sexual *Ulocladium*. Al definir estos ocho linajes filogenéticos, descubrieron que el clado *Ulocladium*, se asemeja al grupo sexual de especies *Infectoriae* (Woudenberg. J.Z. 2015). Aunque ambos grupos no han sido detectados a la fecha en cerezas, su presencia en especies anuales ha podido ser registrada Chile.

Otro estudio realizado para redefinir el género *Alternaria* basado en la concatenación de secuencias de los genes *GAPDH*, *RPB2* y *TEF1* clasificó otros géneros como sinónimos del género *Alternaria*, entre ellos se encuentran *Allewia*, *Brachycladium*, *Chalastospora*, *Chmelia*, *Crivellia*, *Embellisia*, *Lewia*, *Nimbya*, *Sinomyces*, *Teretispora*, *Ulocladium*, *Undifilum* e *Ybotromyces*. (Woudenberg. J.Z. 2013).

En conclusión, todo lo anterior no hace más que demostrar lo difícil que es la clasificación de este género. Hoy las herramientas moleculares son la base técnica para desarrollar diagnósticos rápidos y confiables, que nos permitan establecer las especies dominantes causando diversas enfermedades en nuestros cultivos.

Antecedentes de Estudios Filogenéticos en Chile

A nivel filogenético el género *Alternaria* ha sido recientemente estudiado en Chile a partir de la enfermedad conocida como "Corazón Mohoso" que ataca manzanas (Elfar et al., 2018). Esta enfermedad es producida por un complejo del género *Alternaria* integrado por al menos las siguientes especies: *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. dumosa*, *A. arborescens* (Figura 6).

De acuerdo a nuestros primeros estudios en aislados rescatados desde frutos sintomáticos de cerezas con pudrición negra (Cabrera et al., 2019), temporada 2017-18, n=30, todos los individuos pertenecían a la Sección *Alternaria*, dominando la especie *A. arborescens*, luego *A. alternata* y en muy baja frecuencia *A. tenuissima* (Fig. 7).

El presente estudio tiene como uno de sus objetivos establecer cambios sobre la dinámica poblacional considerando aislados rescatados en la temporada 2018-19, y los resultados de estos análisis pueden ser observados en la Fig.8, presentados a través de análisis filogenéticos.

Diagnofruit

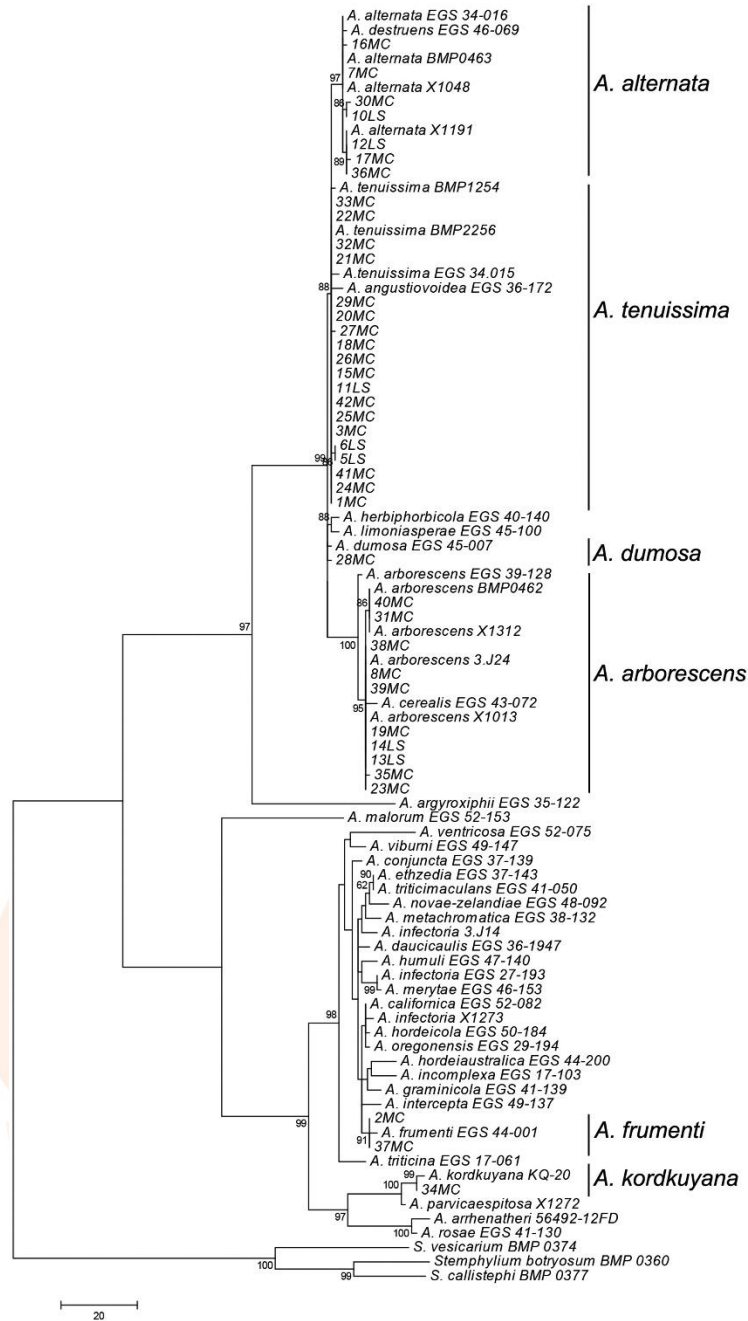


Figura 6. Árbol filogenético obtenido del análisis de máxima parsimonia del gen *ATPase* de membrana plasmática a partir de secuencias de *Alternaria* spp. de manzana chilena y de secuencias de tipos en GenBank. Se muestra el árbol de consenso inferido de los dos árboles más parsimoniosos y los valores de arranque. El árbol estaba enraizado con *Stemphylium botryosum*, *S. callistephi* y *S. vesicarium*. Longitud del árbol = 567, índice de consistencia = 0.747, índice de retención = 0.953, e índice de consistencia reescalado = 0.713. Los números y MC o LS son aislados de *Alternaria* de manzana en Chile; otros códigos son aislados de GenBank (Elfar et al. 2018).

Diagnofruit

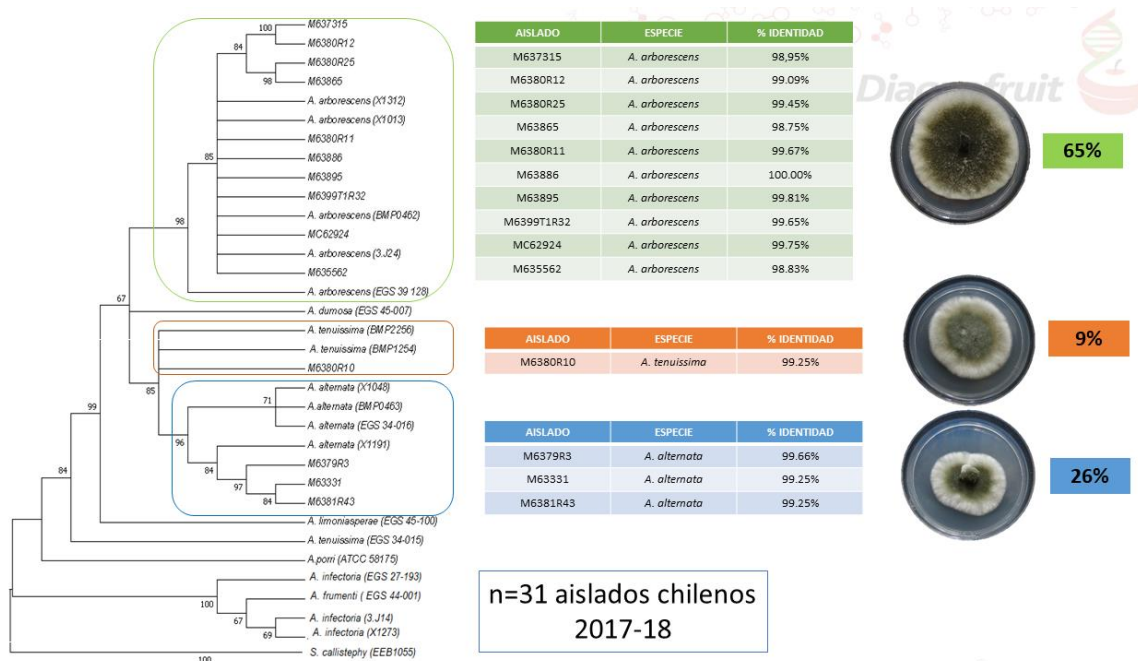


Figura 7. Árbol filogenético obtenido del análisis de máxima parsimonia del gen *ATPasa* de membrana plasmática a partir de secuencias de *Alternaria* spp. De cereza chilena y de secuencias tipos en GenBank. Se muestra el árbol de consenso inferido de los dos árboles más parsimoniosos y los valores de arranque. El árbol estaba enraizado con *Stemphylium callistephi*. Los números y M son aislados de *Alternaria* de cerezas de Chile Temp. 2017-18; otros códigos son aislados de GenBank. (Cabrera et al., 2019)

Resultado de Estudio Filogenético Población 2018-19

El árbol de la Figura 8 muestra la filiación genética realizada a través de Maximum Likelihood entre individuos chilenos (claves de individuos con letra y número) y genomas de individuos obtenidos desde GenBank (Claves de individuos con especie), basados en la información de Lawrence *et al.*, 2012, considerando secuencias del gen Calmodulina y *ATPasa*. De acuerdo a esto el 100% de los individuos pertenece a la sección *Alternaria*, todos agrupados en un clado bien definido, tal como se pudo caracterizar en la temporada 2017-18.

Aunque es necesario realizar secuenciación a más genes para asegurar la pertenencia de cada aislado a una especie, de acuerdo al análisis filogenético y coincidencia con bases de datos (GenBank) podemos realizar un acercamiento a especie probable de cada individuo rescatado desde la temporada 2018-19. El resultado de dicho ejercicio se puede observar en el gráfico 1. Al igual que en la temporada 2017-18 la especie dominante sería *A. arborescens*, con una frecuencia del 59%, por lo tanto claramente el control de la enfermedad debe ir dirigido a ese grupo. Una segunda especie probable, que no había sido detectada en estudio anterior fue *A. destruens* con una frecuencia del 13%. La segunda frecuencia más alta, al igual que en 2017-18, fue *A. alternata*, con un 20%. Otras especies, como *A. tenuissima*, *A. radhina*, *A. resedae* cierran el cuadro con mínimas frecuencias de detección.

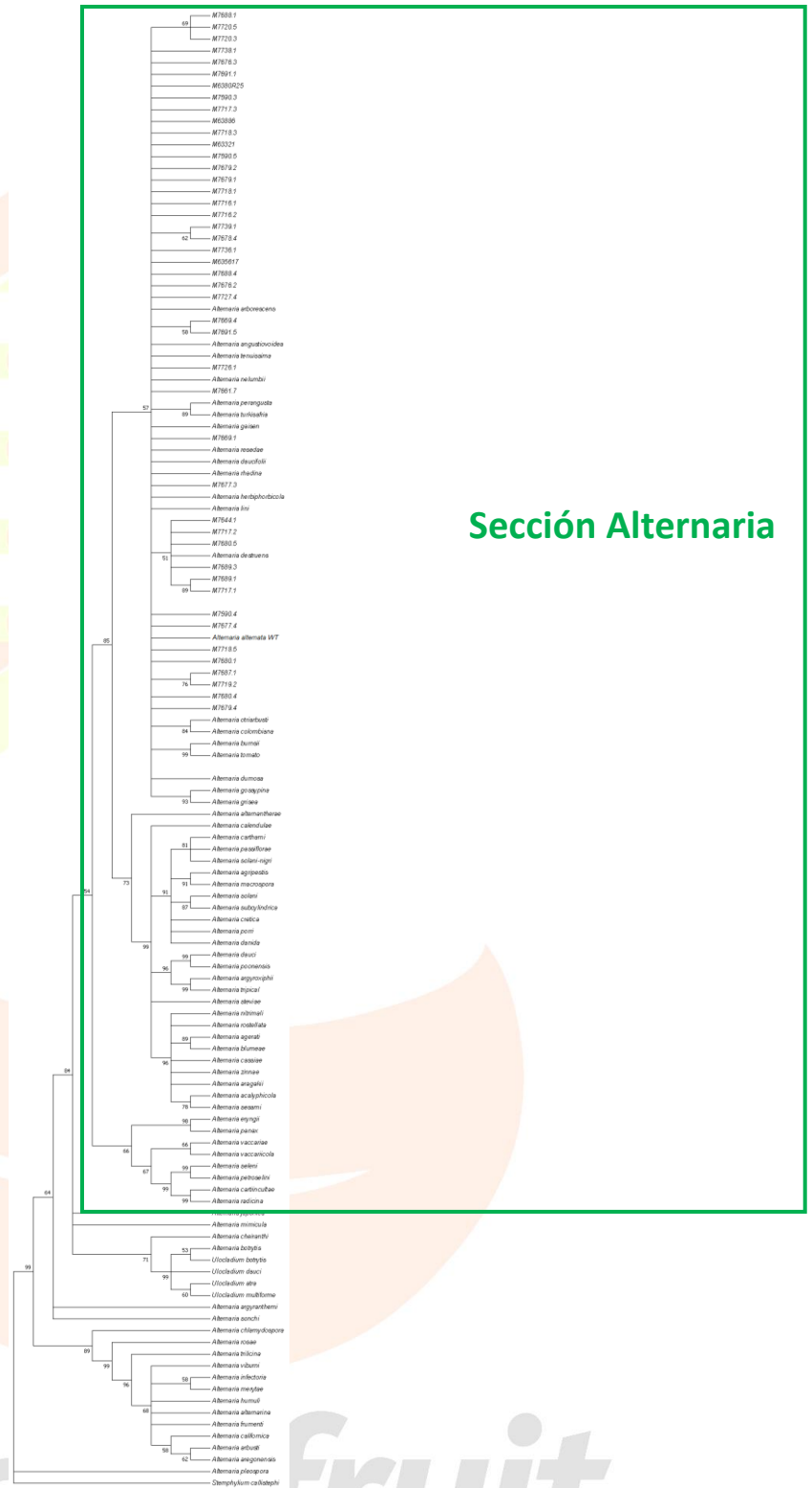


Figura 8. Árbol filogenético obtenido del análisis de máxima parsimonia del gen ATPasa de membrana plasmática y Calmodulina (Cal) a partir de secuencias de *Alternaria* spp. De cereza chilena y de secuencias tipos en GenBank. Se muestra el árbol de consenso inferido de los dos árboles más parsimoniosos y los valores de arranque. El árbol estaba enraizado con *Stemphylium callistephi*. Los números y M son aislados de *Alternaria* de cerezas de Chile Temp. 2018-19; otros códigos son aislados de GenBank

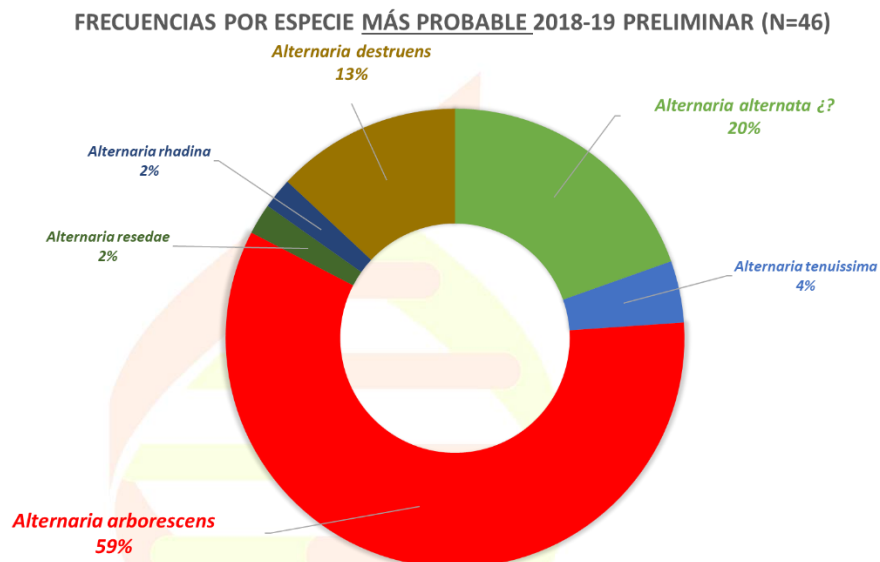


Gráfico 1. Frecuencias de especies probables de aislados rescatados desde frutos sintomáticos de cerezas pertenecientes a la temporada 2018-19.

Cuantificación Inóculo Temporadas 2018-19 y 2019-20 y su Impacto Sobre la Incidencia de la Enfermedad.

Durante las dos últimas temporadas hemos llevado un completo estudio sobre carga de *Alternaria spp.* (entre otros hongos y bacterias fitopatógenas) en 45 unidades productivas de la zona centro sur de Chile. El análisis se realizó a través de la técnica qPCR utilizando un par de partidores específicos para el género *Alternaria* (Figura 9). Los muestreos se desarrollan en plena flor, inicio color pajizo, y cosecha. Los resultados se muestran en el gráfico 1.

Las dos últimas temporadas han sido catalogadas como secas, con baja humedad relativa y escasas lluvias, características que no hacen más que evidenciar la sequía más grave de la que se tenga registro. Como es de esperar, la carga de inóculo y problemáticas de pudrición en cosecha y post-cosecha han sido mínimas, y menores en la temporada 2019-20, tal como se puede observar a nivel de inóculo en campo. Desde flor pudimos observar que la cantidad de inóculo presente en los huertos en 2019 era menor a lo registrado el año anterior, que ya había sido caracterizado como un año con baja frecuencia de pudriciones. En color pajizo y cosecha se observó un comportamiento similar, lo que nos hizo predecir una temporada sin problemas de pudriciones en cosecha ni en almacenaje, tal como ocurrió.

De esta forma, el ambiente claramente modela la carga de inóculo de *Alternaria*, y fija los umbrales de riesgo para el desarrollo de pudriciones, lo que se suma a susceptibilidad varietal, frecuencias de frutos con aberraciones, etc. Es muy importante llevar a cabo

monitoreos para entender a través de información de largo plazo el comportamiento de esta y otras enfermedades que afectan nuestras cerezas.



Figura 9. Esquema de toma de muestras y análisis qPCR monitoreo de Patógenos en huertos de cerezos.

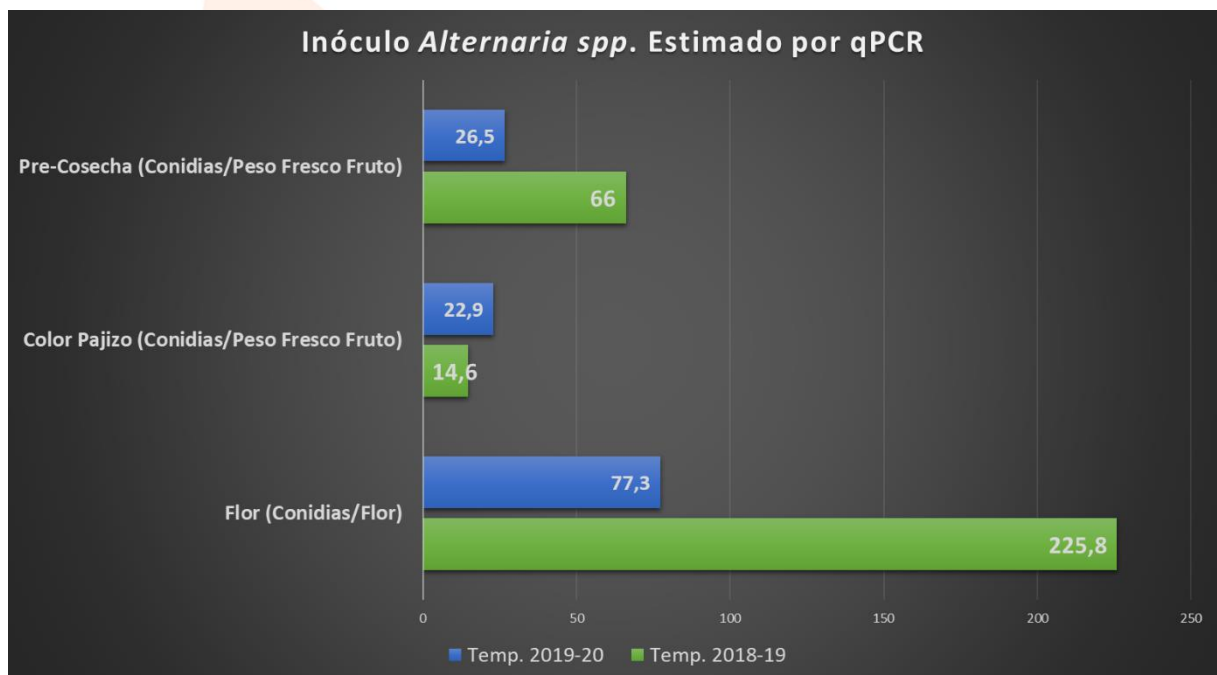


Gráfico 2. Inóculo promedio de *Alternaria* sobre flores o frutos considerando 45 unidades de muestreos, desde Región Metropolitana a Del Maule, estimado a través de qPCR durante las temporadas 2018-19 y 2019-20.

Análisis de Sensibilidad a Fungicidas

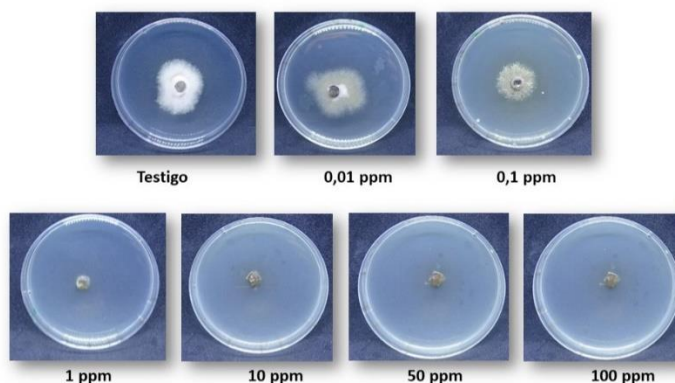
Con el objetivo de actualizar los conocimientos sobre sensibilidad de poblaciones locales de *Alternaria spp.* hacia fungicidas en formulaciones comerciales se realizó un estudio acotado para caracterizar este comportamiento y proyectar niveles de control en campo, conocimiento base para la construcción de programas fitosanitarios específicos.

Origen de aislados monospóricos. Un total de 10 aislados de *Alternaria* fueron analizados, todos recuperados desde frutos sintomáticos de cerezo desde huertos en producción colectados en la temporada 2018-19 de las Regiones Maule y O'Higgins. Se obtuvieron aislados monoconidiales, de acuerdo con el procedimiento descrito por Pryor y Michailides.

Medios y determinación de sensibilidad a fungicidas. Los fungicidas seleccionados por CDC, representantes de diversos grupos químicos fueron los siguientes: tebuconazole, Penthiopirad y las formulaciones en mezcla Difenoconazol&Azoxystrobin, Fludioxonil&Fenhexamid, y Boscalid&Piraclostrobin. Siguiendo el protocolo propuesto por Reuveni y Sheglov con algunas modificaciones, en PDA autoclavado y enfriado a 50 ° C se añadirá la formulación comercial para obtener concentraciones crecientes de los activos (Figura 10). Cada análisis se realizó en duplicado por aislado a modo de repeticiones. Con la ayuda de un sacabocados de 5 mm de diámetro, se extrajeron discos de micelio desde los márgenes de una colonia activa, colonias con una edad de 72 h crecidas en PDA (Figura 2); las cuales fueron colocadas invertidas en el centro de la placa Petri modificada que contendrá el fungicida o medios no modificados (control). Los cultivos fueron incubados a 24 ° C en oscuridad durante 7 días. Pasado este tiempo, se midió el crecimiento radial de cada aislado (menos el diámetro del disco de inoculación) después de 7 días, determinando la media de dos diámetros medidos de forma perpendicular con pie de metro digital y expresada como el porcentaje en función del diámetro medio del control no tratado. Para las pruebas de Crecimiento Miceliar los valores **EC50 (concentración efectiva que reduce el crecimiento miceliar en un 50% de cada aislado)** se calcularon a través de la regresión de inhibición relativa del crecimiento frente a la concentración de fungicida.

Sensibilidad a fungicidas químicos, *Alternaria*

Metodología: Crecimiento miceliar (CM); N = 7 concentraciones



Diagnofruit

Figura 10. Prueba de crecimiento miceliar para alternaría, utilizando 7 concentraciones.

Los EC₅₀ calculados por aislado hacia cada formulación pueden ser observados en la tabla 2 y los resultados promedio por formulación considerando toda la población analizada pueden ser visualizados en el gráfico 3.

Tabla 2. EC₅₀ por Fungicida Comercial calculado para cada aislado de *Alternaria* incluido en la investigación.

Especie Probable	EC ₅₀ Promedio (ppm)				
	Boscalid&Piraclostrobin	Difenoconazol&Azoxystrobin	Fludioxonil&Fenhexamid	Penttiopirad	Tebuconazole
<i>A. alternata</i>	0,15	0,10	0,08	1,09	0,35
<i>A. alternata</i>	3,47	3,58	0,10	1,89	12,74
<i>A. alternata</i>	12,82	1,53	0,51	4,57	6,26
<i>A. arborescens</i>	0,11	0,10	0,08	0,11	0,67
<i>A. arborescens</i>	0,13	0,10	1,03	0,10	0,66
<i>A. arborescens</i>	1,93	2,76	0,07	0,65	16,50
<i>A. arborescens</i>	1,22	1,35	0,23	28,31	3,40
<i>A. arborescens</i>	0,52	2,47	0,21	2,63	4,33
<i>Alternaria spp.</i>	9,09	1,69	0,16	16,66	1,34
<i>Alternaria spp.</i>	10,99	4,55	0,20	2,31	25,62
Promedio	4,04	1,82	0,27	5,83	7,19

EC₅₀ (ppm) promedio *Alternaria spp.* Aislados desde Cerezas (2018-19) por Formulación Comercial (n=10)

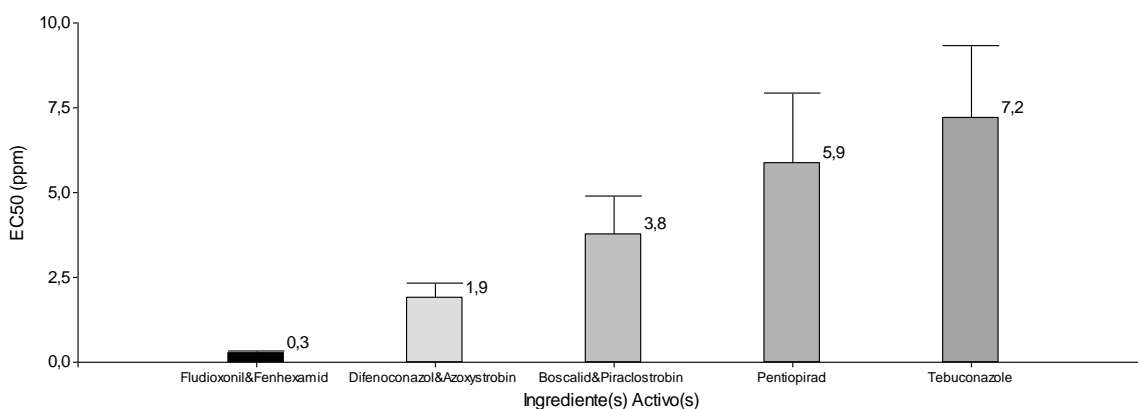


Gráfico 3. EC₅₀ poblacional promedio para cada formulación comercial testeada.

En términos generales los niveles de EC₅₀ obtenidos son bajos a moderados, lo que, de forma teórica, proyecta control aceptable del patógeno en campo con todas las formulaciones. Estudios anteriores, realizados en poblaciones rescatadas desde frutos enfermos en la temporada 2017-18, muestran valores similares, de esta forma el EC₅₀ promedio para tebuconazole en 2017-18 disminuyó casi a la mitad en 2018-19, similar comportamiento registramos para fludioxonil&fenhexamid y difenoconazole&azoxystrobin, caracterizando un comportamiento estable de los activos entre temporadas.

Sin embargo, es importante continuar con programas de monitoreo de sensibilidad a fungicidas, ya que, en parte de las formulaciones, sobre todo en aquellas asociadas a

moléculas del grupo de las carboxamidas, podemos encontrar individuos con Factores de Resistencia (FR) por sobre lo óptimo. El factor de resistencia nos habla de cuán resistente es un individuo a un fungicida en específico, y es en palabras simples es la relación matemática entre el nivel basal (EC₅₀ individuo Sensible) y el valor de la población resistente o del aislado en análisis. Se asume, como dato exploratorio, que un FR por sobre 100 implica que el individuo o población posee algún mecanismo de resistencia (mutación o mutaciones) hacia el fungicida en análisis. En la tabla 3 podemos observar los valores de FR para cada individuo por formulación comercial ensayada y en rojo aquellos que muestran valores de FR que representarían alta resistencia, cercanos o superiores a 100.

La aparición de individuos o poblaciones resistentes de fitopatógenos como *Alternaria* y *Botrytis* es un mal que tarde o temprano sucederá en el huerto, por lo tanto debemos aprender a convivir con el fenómeno; nuevamente, importante mencionar, el monitoreo es absolutamente necesario para mantener las poblaciones en los niveles observados en el presente estudio, donde los individuos con carácter resistente no dominan y los tratamientos de control en etapas oportunas debieran ser efectivos.

Tabla 3. Factor de Resistencia calculado para cada individuo en virtud de valor de EC₅₀ basal.

Especie Probable	Boscalid&Piraclostrobin	Difenoconazol&Azoxystrobin	Fludioxonil&Fenhexamid	Penthiopirad	Tebuconazole
<i>A. alternata</i>	1	1	1	11	1
<i>A. alternata</i>	32	36	1	19	36
<i>A. alternata</i>	117	15	6	46	18
<i>A. arborescens</i>	1	1	1	1	2
<i>A. arborescens</i>	1	1	13	1	2
<i>A. arborescens</i>	18	28	1	7	47
<i>A. arborescens</i>	11	14	3	283	10
<i>A. arborescens</i>	5	25	3	26	12
<i>Alternaria spp.</i>	83	17	2	167	4
<i>Alternaria spp.</i>	100	46	3	23	73
Promedio	37	18	3	58	21

Aunque no tenemos un número de aislados adecuado, es posible, a modo exploratorio, caracterizar el comportamiento de las distintas especies de *Alternaria*, con respecto a sus respuestas hacia fungicidas. El gráfico 4 nos muestra un análisis de Componentes Principales entre las Especies y los resultados de EC₅₀ para cada fungicida. Lo primero que debemos hacer es separar con una línea imaginaria desde la componente 1 (CP 1) en el punto 0,00, desde ahí podemos observar que *A. arborescens* y *A. alternata* comparten posición en el hemisferio derecho y *Alternaria spp.* se distancia en el otro hemisferio. De acuerdo a esto, podemos establecer un comportamiento más parecido entre *A. arborescens* y *A. alternata* (Círculo azul), lo que nos mejora las expectativas de control ya que ambas especies son las que dominan de acuerdo a los estudios de dos temporadas. Al mismo tiempo *Alternaria spp.* tendrían un comportamiento más asociado a EC₅₀ más altos,

ya que está más cerca de dichos parámetros en el gráfico, sin embargo, son especies más bien secundarias o terciarias dentro de las poblaciones estudiadas.

Tebuconazole y difenoconazole&azoxystrobin tienen una relación directa (observar ángulo agudo formado entre ambas directrices), en otras palabras habría una pérdida de sensibilidad cruzada directa, lo que tiene lógica ya que tebuconazole y difenoconazole pertenecen al mismo grupo químico, y se llevan gran parte el efecto de control, independiente de que uno de estos vaya en mezcla, debido a la conocida pérdida de sensibilidad de poblaciones de *Alternaria* hacia estrobilurinas.

Pentiopirad, tebuconazole, difenoconazole&azoxystrobin y boscalid&piraclostrobin presentarían comportamientos, en términos de tendencia, similares dentro de la población al analizar los resultados de EC₅₀; fludioxonil&fenhexamid, se posiciona en relaciones más bien inversas o neutras con respecto a los demás fungicidas, lo que lo posiciona como un buen rompedor de posibles procesos de selección, de ahí la importancia de realizar alternancia en el uso de fungicidas y de alta eficacia.

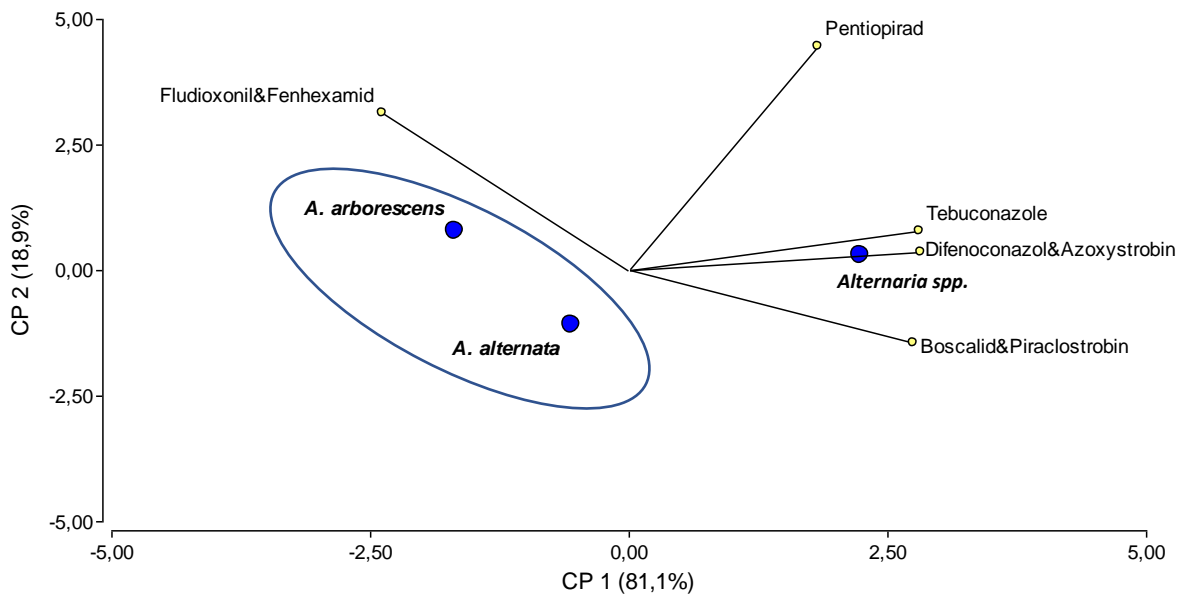


Gráfico 4. Análisis componentes principales.

Diagnofruit

Consideraciones Finales y Propuesta de Control

Sin duda, partir con un **huerto limpio** es una de las bases de un control efectivo. Durante los años de monitoreo de *Alternaria* y otros hongos causantes de pudriciones en cerezos, hemos podido establecer que aquellos huertos que realizan cosechas sucias (fruta con problemas no es colectada y queda colgando en los árboles generando frutos momificados en otoño-invierno, Foto 4) poseen niveles de inóculo de entrada más altos que aquellos limpios. De esta forma mantener un huerto sin fuentes de inóculo, considerando este tipo de frutos, es fundamental para partir con el pie derecho la temporada.

Tal como ocurre al estimar sensibilidad hacia fungicidas de las poblaciones de patógenos presentes en un área determinada de manejo, es fundamental conocer la cantidad de inóculo, que de forma epífita coexiste en nuestros huertos; de esta forma, caracterizamos de forma estandarizada y comparable el estatus sanitario del huerto y marcamos la temporada en función del riesgo.



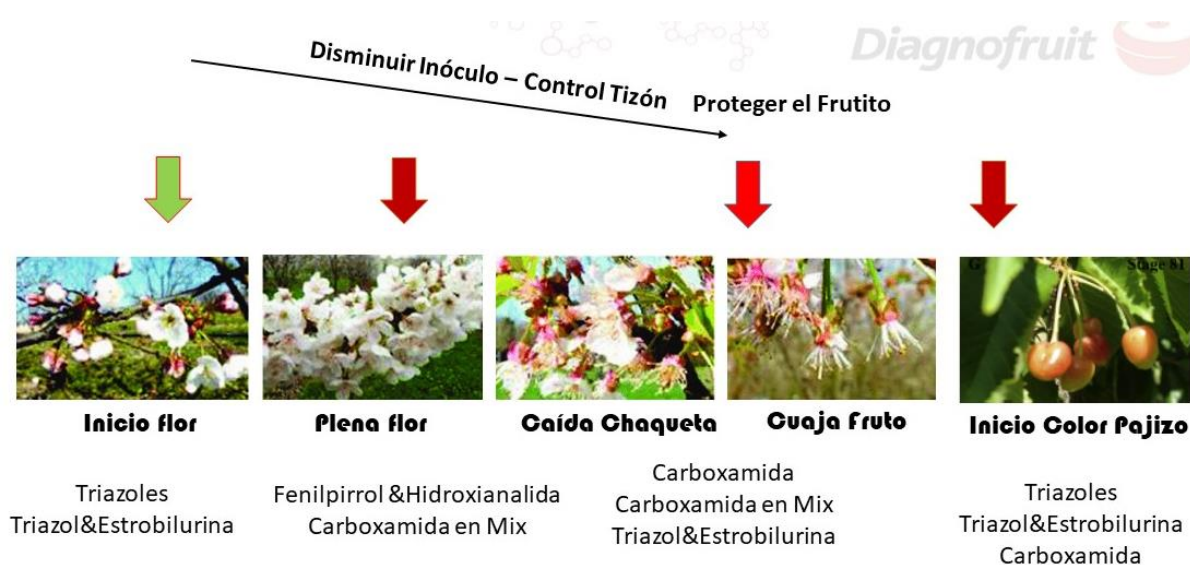
Foto 4. Frutos momificados.

De esta forma, es fundamental cuantificar la cantidad no solo de *Alternaria*, también otros hongos como *Botrytis* y/o *Geotrichum* presentes en unidades productivas “foco”, donde un conocimiento estacional pueda ser proyectado al predio o localidad. Estos **sistemas de monitoreo** deben ser implementados al menos dos veces en la temporada en etapas tempranas de desarrollo del fruto (floración) y luego comenzando el quiebre de color, todos los años con el objetivo de generar un registro histórico comparable.

Si bien la **incidencia de la enfermedad** está ligada a factores climáticos de temporada, fundamentalmente de primavera (alta humedad, precipitaciones, y luego temperaturas moderadas a cálidas), existen **combinaciones de generan mayores condiciones para el desarrollo de la enfermedad**, como lo son **huertos vigorosos (alto nivel de nitrógeno), riego por aspersión** y uso de **coberturas**, todos detalles que conspiran para la obtención de fruta sana. Importante llevar un registro anual de concentración de Nitrógeno en frutos colectados 10 días antes de cosecha.

En aquellos huertos que la enfermedad persiste, muchas veces ligada además a otras pudriciones, es recomendado realizar un análisis más profundo de las poblaciones existentes, **determinar frecuencias de especies y un completo diagnóstico de resistencia a fungicidas** para establecer el mejor programa de control para la realidad particular.

En términos de manejo químico de la enfermedad, un control eficiente se logra a través de la conjunción de la elección del ingrediente activo adecuado y la época precisa para realizar la labor. Según estudios previos bajo condiciones de temporada seca, **el periodo crítico de infección es entre caída de chaqueta y primeros milímetros de crecimiento de fruto**, cuando éste recién se expone al ambiente.



1. La elección de cada producto a utilizar depende del grupo qco anterior
2. No superar dos aplicaciones de Carboxamida- Escoger distinto Ingrediente Activo

Figura 11. Esquema y propuesta de control para Pudrición Negra de Cerezas. Flechas Verticales indican momento de aplicación, más abajo se indican los grupos químicos y formulaciones aconsejadas para la etapa.

En la figura 11 se describe una propuesta base para el control de la enfermedad. De forma teórica, sabiendo que el periodo crítico comienza hacia el fin de la floración, es fundamental comenzar a **bajar el inóculo en la etapa previa, que va desde inicio de floración hasta caída de pétalos**, etapa donde además debemos cubrir para el control de Tizón de Flor.

El segundo punto crítico a proteger será el periodo desde **caída de chaqueta a primeros milímetros de crecimiento del fruto**, en esta etapa es crucial **activos de acción potente Alternaricida** como carboxamidas.

Muy importante, el activo a escoger para cada etapa debe considerar el utilizado en las aplicaciones precedentes en la temporada, de esta forma se recomienda el uso solo de dos aplicaciones de carboxamidas durante el periodo de desarrollo de frutos, sin repetir el mismo activo, aprovechando la amplitud de nuevas formulaciones de este grupo químico hoy en el mercado. Las formulaciones que consideran fenilpirrol (fludioxonil) y triazoles como difenoconazol poseen especial control tanto para Pudrición Negra como para Tizón de Flor por lo tanto se recomienda su uso en etapas críticas más cercanas a flor.

Las etapas descritas, generalmente, se traslapan, por lo tanto mantener cubierto el huerto con una periodicidad adecuada es fundamental para evitar la colonización y por esto al menos se recomiendan 3 aplicaciones en la fase, y probablemente una cuarta en huertos problemáticos de floraciones heterogéneas. Siempre se debe evaluar caso a caso, con antecedentes históricos y de temporada, no utilizar recetas o recomendaciones como un DOGMA.

Si se observa desarrollo de lesiones en etapas cercanas a **color pajizo** se debe realizar aplicación considerando una de las formulaciones descritas, la elección depende de los activos aplicados en floración; dicha aplicación también ayudará a prevenir pudrición gris causada por *B. cinerea*, esta enfermedad comienza su etapa crítica de control en el proceso de quiebre de color del fruto. El monitoreo semanal de frutos a inicio de quiebre de color o color pajizo, es recomendado, para establecer frecuencias de pudriciones incipientes, información útil para definir la estrategia de manejo fitosanitario a cosecha.

Para finalizar y a modo de resumen, un programa de control para la enfermedad debe primero establecerse sobre datos e información histórica, la que puede ser capturada a través de métodos de monitoreo en huerto, laboratorio y/o packing, de esta forma cada temporada debe ser diagnosticada en virtud de parámetros de incidencia, inóculo y resultado final. Al mismo tiempo, dicha información se debe cruzar con la lectura climática, sobre todo el comportamiento en términos de humedad y temperaturas en primavera temprana (periodo de flor) consolidando de esta forma umbrales de riesgo específico para cada unidad productiva. Un tercer eje para el control exitoso, es el programa químico, que como se describió debe ser realizado en las etapas críticas para la especie, desde la floración a primeros centímetros de desarrollo del fruto, considerando activos y grupos químicos recomendados; el número de aplicaciones depende de la historia y nivel de riesgo de la temporada en curso, además de caracterización de hitos fenológicos como heterogeneidad de floración. Un último eje debe ser considerado, y tiene que ver con calidad de fruta, parámetros de evolución de madurez, partiduras, mal cierre de sutura, contenido de nitrógeno deben ser establecidos y cuantificados anualmente para el desarrollo de estrategias de control efectivas con una mirada integradora.



Diagnofruit

Referencias

- 1) Woudenberg. J.Z. Groenewald. M. Binder P.W. et. al. *Alternaria redefined*. Studies in Mycology [2013]. Vol 75. Disponible en: <https://doi.org/10.3114/sim0015>
- 2) Dang. Ha X. Pryor. B. Peever. T. et. al *The Alternaria genomes database: a comprehensive resource for a fungal genus comprised of saprophytes, plant pathogens, and allergenic species*. BMC genomics [2015] Article number: 239. Disponible en: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-015-1430-7>
- 3) Woudenberg. J. Seidl. M.F. Groenewald. J.Z. et. al. *Alternaria section Alternaria: ¿Species, formae speciales or pathotypes?* Studies in Mycology [2015] Vol. 82 Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>
- 4) Importance of multisite fungicides in managing pathogen resistance, FRAC 2018
- 5) Avenot. H.F. T.J.Michailides *Detection of isolates of Alternaria alternata with multiple-resistance to fludioxonil, cyprodinil, boscalid and pyraclostrobin in California pistachio orchards* Crop Protection 78 [2015] Disponible en : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219415301125>
- 6) Parrado. J. Antigua. G. Díaz J.A. et. al. *Efectividad del fungicida Pyraclostrobin + Boscalid (6,8%+13,6%) sobre Alternaria solani sorauer en el cultivo de papa (Solanum tuberosum)*. Fitosanidad vol. 14 [2010]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/fit/v14n4/fit09410.pdf>
- 7) *Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas*. FAO [2012]
- 8) Ramos. C. *Pudrición negra en frutos de cerezo, causado por un complejo de especie del género Alternaria*. Red agrícola .2019. Disponible en: https://www.redagricola.com/cl/assets/uploads/2019/06/4_ramos_garcia_2019.pdf
- 9) Simmons E. G. *Alternaria. An identification manual* CBS biodiversity series 6, CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands (2007)
- 10) Lawrence. D.P., Gannibal. P.B, Peever. T.L. et. al . *The sections of Alternaria: Formalizing species-groups concepts*. Mycologia [2013] 105:530-546. Disponible en : <https://doi.org/10.3852/12-249>
- 11) Zhu and Chang. 2004. China Fruits 3(9):23-25.
- 12) Thomidis et. al. *First Report of Alternaria Leaf Spot on Cherry Trees in Greece*. Plant Disease. [2006] 90(5):680. Disponible en: <https://doi.org/10.1094/PD-90-0680C>
- 13) Zhao et. al. *First Report of Black Spot Disease Caused by Alternaria alternata on Cherry Fruits in China*. Plant Disease [2012] 96(10): 1580. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0416-PDN>
- 14) Lawrence, D.P., Gannibal, P.B., Dugan, F.M. et al. *Characterization of Alternaria isolates from the infectoria species-group and a new taxon*

from *Arrhenatherum*, *Pseudoalternaria* *arrhenatheria* sp. nov.. *Mycol Progress* **13**, 257–276 [2014]. Disponible en : <https://doi.org/10.1007/s11557-013-0910-x>

- 15) Danitza Cabrera, Cecilia Ramos, Elisa Miranda-Gómez, Nicolás Cifuentes-Esquivel, Samuel Parra, Carlos Rubilar-Hernández, Miguel López-Jara, Violeta Rojas, Jessica Rodríguez, Héctor García. 2019. “*Avances sobre Etiología y Epidemiología de la Pudrición Negra de la Cereza*”. XXVII CONGRESO DE LA SOCIEDAD CHILENA DE FITOPATOLOGÍA, Arica, Chile.
- 16) Pryor, B., and Michailides, T. J. 2002. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology* 92:406-416.
- 17) Reuveni M. and Sheglov D. 2002. Effects of azoxystrobin, difenoconazole, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in red delicious apple fruit. *Crop Protection* 21(10): 951-955



Diagnofruit